

Prof. dr hab. Bogdan Lesyng
Wydział Fizyki
oraz Centrum Uczenia Maszynowego
Uniwersytet Warszawski
e-mail: Bogdan.Lesyng@fuw.edu.pl

Warszawa, 21.02.2025

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Tytuł rozprawy:

Wykorzystanie metod modelowania komputerowego do poprawy właściwości
katalitycznych enzymu biotechnologicznego Hydrataza Nitrylowa

w języku angielskim

(Improving Catalytic Properties of Biotechnological Enzyme Nitrile Hydratase.
Molecular Modeling Approach)

Autorka rozprawy: Mgr Julia Berdychowska
Promotor rozprawy: Prof. dr hab. Wiesław Nowak, UMK w Toruniu
Promotor pomocniczy: Dr hab. Łukasz Peplowski, prof. UMK

Przedmiotem badań rozprawy są Hydratazy nitrylowe (NHazy) - enzymy, które katalizują hydratację nitryli do amidów. NHazy są metaloenzymami - zawierają kobalt (Co) lub żelazo (Fe) w swoim centrum aktywnym. Najczęściej struktura tych enzymów składa się z dwóch podjednostek: alfa i beta, które tworzą heterodimer lub występują w postaci tetramerycznego kompleksu. Centrum aktywne znajduje się na granicy między tymi podjednostkami i zawiera metal, który jest koordynowany przez reszty cysteiny, histydyny i kwasu glutaminowego. NHazy mają szerokie zastosowanie w biotechnologii i przemyśle, głównie ze względu na ich zdolność do katalizowania hydratacji nitryli do amidów. Są m.in. wykorzystywane do produkcji akryloamidu z akrylonitrylu. Akryloamid jest ważnym związkiem chemicznym stosowanym w przemyśle papierniczym, tekstylnym i kosmetycznym. Jest również używany do produkcji polimerów, które mają szerokie zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu. NHazy są stosowane w procesach biodegradacji i oczyszczania ścieków, gdzie pomagają w rozkładzie toksycznych nitryli do mniej szkodliwych związków. Dzięki temu można wykorzystywać je do ochrony środowiska i poprawy jakości wody. NHazy są używane w syntezie różnych związków farmaceutycznych, w tym leków przeciwbólowych i przeciwzapalnych. Enzymy te umożliwiają selektywną hydratację nitryli, co jest kluczowe w produkcji czystych i skutecznych leków. NHazy są również wykorzystywane do produkcji agrochemikaliów, takich jak pestycydy i herbicydy.

Badania nad hydratazami nitrylowymi prowadzone są od szeregu lat przez prof. Wiesława Nowaka, dr hab. Łukasza Peplowskiego oraz ich współpracowników, w tym m.in. przez Doktorantkę mgr Julię Berdychowską. Badania koncentrują się na różnych aspektach struktury, funkcji i mechanizmów działania tych enzymów z wykorzystaniem metod biofizyki teoretycznej i bioinformatyki.

Celem badań mgr Julii Berdychowskiej były analiza zmian struktury i aktywności kilku wariantów NHaz w niestandardowych warunkach molekularnego otoczenia w celu zrozumienia ich dynamiki oraz poprawy ich właściwości biotechnologicznych z wykorzystaniem różnorodnych metod biofizyki teoretycznej i obliczeniowej. Jej praca koncentrowała się na analizie strukturalnej i dynamicznej NHaz, co pozwala na lepsze zrozumienie mechanizmów katalitycznych tych enzymów. Badała również potencjalne zastosowania NHaz w syntezie związków chemicznych o wysokiej wartości przemysłowej. W pracy Doktorantka skoncentrowała się na enzymie stosowanym w biotechnologicznej produkcji akrylamidu. Enzym (pochodzi z bakterii *P. thermophila* JCM 3095 (pdb:1IRE), *Streptomyces thermoautotrophicus* oraz *P. Putida* (pdb: 3QXE). W łagodnych warunkach fizykochemicznych katalizuje hydratację akrylonitryli do akrylamidów. Szczegółowy mechanizm katalityczny działania enzymu jest do tej pory przedmiotem dyskusji. W niniejszej rozprawie skupiono się nad trzema praktycznymi aspektami związanymi z molekularnym otoczeniem NHazy:

- polepszaniem aktywności,
- poprawą termostabilności tego białka oraz
- wyjaśnieniem przyczyn spadku aktywności enzymu przy dużych stężeniach produktu.

Wyniki badań przedstawione są m.in. w dwóch artykułach do których odwołuje się rozprawa:

- Guo J, **Berdychowska J A**, Lai Q, Meng Y, Cheng Z, Peplowski Ł, Zhou Z: "*Toolbox*" construction of an extremophilic nitrile hydratase from *Streptomyces thermoautotrophicus* for the promising industrial production of various amides, International Journal of Biological Macromolecules, vol. 221, 2022, s. 1103-1111, DOI:10.1016/j.ijbiomac.2022.09.071, 100 pkt., IF (8,2) , Elsevier – nauki biologiczne/fizyczne
- Guo J, Cheng Z, **Berdychowska J A**, Zhu X, Wang L, Peplowski Ł, Zhou Z: *Effect and mechanism analysis of different linkers on efficient catalysis of subunit-fused nitrile hydratase*, International Journal of Biological Macromolecules, vol. 181, 2021, s. 444-451, 100 pkt., IF (8,025); Elsevier – nauki biologiczne/fizyczne

Poza tym Doktorantka jest współautorką trzech innych publikacji nie związanych bezpośrednio z tematyką pracy doktorskiej.

Przechodząc do bardziej szczegółowej analizy uzyskanych przez Autorkę rozprawy. Celem badań było modelowanie komputerowe zmian struktury kilku wariantów tego enzymu w niestandardowych warunkach w celu zrozumienia jego dynamiki i poprawy właściwości biotechnologicznych. Problemem jest to, że enzym ten traci swoją aktywność w wysokiej temperaturze oraz przy dużych (>50%) stężeniach produktu - akrylamidu. W oparciu o oryginalne symulacje MD zbadano modyfikacje NHazy prowadzące do jej zwiększonej termostabilności. Te modyfikacje polegały na połączeniu podjednostek za pomocą peptydów. W oparciu o obliczenia prezentowane w rozprawie zaproponowano szereg wariantów NHaz, które w badaniach eksperymentalnych wykazały przewidywaną zwiększoną stabilność. Zbadano m.in. szczegółowo dynamikę białka *Wild Type* w roztworach wodnych zawierających 0%, 20%, 50% stężeń wagowych akrylamidu, poszukując efektów wywołanych silną zmianą charakteru otoczenia w miarę postępu reakcji. Dokładnie został zbadany transport ligandów w białku, w szczególności cechy geometryczne kanału prowadzącego do centrum aktywnego. Analiza roztworów zawierających jednocześnie aminy i nityle pokazuje że budowa kanałów w NHazie jest taka, że preferują one obecność nityli. Sformułowano wniosek, że spadek aktywności enzymu nie jest związany z autoinhibicją enzymu ale istotniejszą rolę odgrywa jego częściowa denaturacja oraz wraz ze stężeniem amidów zanik oddziaływań z centrum katalitycznym dwóch istotnych dla reakcji enzymatycznej arginin (β Arg52 i β Arg157). Badania pozwoliły też na zaobserwowanie zjawiska kooperatywności w komunikacji pomiędzy dimerami w tetramerze.

Pozytywnie oceniam jakość i ważność z punktu widzenia praktycznych zastosowań uzyskanych przez Autorkę rozprawy wyników. Niemniej mam kilka krytycznych uwag lub pytań:

1. Strona 37. „Najlepszy model został utworzony na podstawie białka 3VYH (GMQE 9.1)” – GMQE oznacza *Global Model Quality Estimate* – ten współczynnik zawarty jest na ogół w granicach [0,1] – skąd zatem taka wysoka wartość, tym bardziej że w Tabeli 5.1 na stronie 49 wartości te są rzędu 0.8 - 0.9.
2. Strony 38 i 39. Nie do końca jest jasne w jakich przypadkach wykorzystywano parametryzację uzyskaną wcześniej metodą DFT/B3LYP/6-31G(d,p) a w jakich HF/6-31G*, i na ile są one komplementarne.
3. Pytanie, dlaczego używano parametryzacji Charmm 27 a nie 36, które jest nowsze ?
4. Strona 38. „Linkery A8, B8 C8 zostały utworzone z użyciem programu I-Tasser”. I-TASSER w zasadzie nie jest standardowym narzędziem do projektowania linkerów. Może użycie narzędzi takich jak RosettaRemodel byłoby bardziej uzasadnione dla projektowania linkerów ?

5. Strona 39. „Analiza składowych głównych (PCA) została przeprowadzona za pomocą pakietu Bio3D w języku R.” - dotyczy wniosków płynących z tej analizy. PCA w Bio3D wymaga starannej selekcji atomów. Nie podano jakie atomy uwzględniono (np. Ca czy dokładną strukturę). Poza tym przydałby się nieco bardziej szczegółowy opis takich narzędzi jak Eucb oraz CAVER.
6. Strona 40. Nie jest do końca jasne jak wykonywane były symulacje pod stałym ciśnieniem. W szczególności jaki model barostatu był stosowany.
7. Pracę prawdopodobnie udoskonaliloby zastosowanie AlphaFoldu, choćby dla porównania modeli uzyskanych przy pomocy konwencjonalnych metod i później zwiniętych przy pomocy AlphaFoldu – zastosowanie tego ostatniego dla kilku białek to zadanie które teraz wykonuje się w ciągu kilku dni.
8. Istotniejsza uwaga. Biorąc pod uwagę proponowane mechanizmy katalityczne NHazy (Rysunek 1.4) może warto było rozważyć zastosowanie kwantowo-klasycznej dynamiki molekularnej QM/MM, choćby przy zastosowaniu półempirycznego kwantowego hamiltonianu PM6 lub PM7, która to metoda zaimplementowana jest w środowisku NAMD i całkiem nieźle radzi sobie z symulacją kilku stopniowych reakcji enzymatycznych. Tu mogłaby być zastosowana do walidacji alternatywnych ścieżek reakcji.

Powyższe uwagi nie umniejszają znacząco najistotniejszych osiągnięć Doktorantki zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej. Uzyskane wyniki są wartościowe dla bardzo ważnego z technologicznego punktu widzenia enzymu. Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Julii Berdychowskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w dyscyplinie nauk fizycznych. Recenzowane dzieło spełnia ustawowe (tj. ustawa – ustawa z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późniejszymi zmianami)) oraz zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę o dopuszczenie mgr Julii Berdychowskiej do dalszych etapów postępowania prowadzącego do uzyskania stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauki fizyczne.

Prof. dr hab. Bogdan Lesyng